



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLAN



EFFECTO MUTAGENICO INDUCIDO POR CAPSAICINA
SOBRE ERITROCITOS POLICROMATICOS DE SANGRE
PERIFERICA DETECTADO MEDIANTE LA PRUEBA DE
MICRONUCLEOS EN UN ESTUDIO SUBAGUDO IN VIVO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

Que para obtener el Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P r e s e n t a n

EDUWIGIS ELODIA CALDERON MONTELLANO
LICURGO RAMIREZ HERRERA

Directores de Tesis :

M. C. Sandra Díaz Barriga Arceo
DR. Eduardo Madrigal Bujaidar

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México 1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

INDICE

I	.- RESUMEN.....	1
II	.- GLOSARIO.....	2
III	.- INTRODUCCION	
	- Definición y antecedentes de la prueba de micronúcleos.....	3
	- Importancia del estudio de los micronúcleos y sistemas de ensayo.....	6
	- Formación de micronúcleos y compuestos inductores.....	12
	- Propiedades fisicoquímicas y efectos farmacológicos de la capsaicina.....	14
	- La capsaicina y sus efectos tóxicos, genotóxicos y cancerígenos.....	20
IV	.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS	
	- Hipótesis.....	25
	- Objetivo primario.....	25
	- Objetivos secundarios.....	25

V .- MATERIAL Y METODOS

- Material biológico.....	26
- Soluciones administradas a los ratones.....	26
- Procedimiento previo al estudio de micronúcleos.....	26
- Procedimiento para el estudio de micronúcleos en EPC de sangre periférica.....	29
- Análisis estadístico.....	32
VI .- RESULTADOS.....	33
VII .- DISCUSION.....	41
VIII.- CONCLUSIONES.....	45
IX .- BIBLIOGRAFIA.....	46

R E S U M E N

I. RESUMEN

Para efectuar el presente estudio genotóxico se realizó una administración intraperitoneal durante 32 días (tres días de inoculación por uno de descanso) a ratones macho de la cepa NIH con capsaicina, principio picante del chile cuyo nombre químico es 8-metil-N-vainillil-6-nonenamida.

Se probaron dos dosis, estas fueron de 1.46 y 1.94 mg/kg de peso, además de los correspondientes controles. Cada octavo día se obtuvo sangre mediante un corte transversal de cola y se realizaron frotis, los cuales se tiñeron con Giemsa. Se determinó: la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados y la relación porcentual de eritrocitos policromáticos entre normocrómicos en sangre periférica.

Los resultados mostraron un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados hasta el día 32avo de inoculación, para la dosis de 1.46 mg/kg, y a partir del 16avo día para la dosis de 1.94 mg/kg. La relación de los eritrocitos policromáticos entre eritrocitos normocrómicos se modificó significativamente solo con la dosis de 1.94 mg/kg a partir del octavo día de tratamiento.

Los resultados obtenidos muestran que el efecto clastogénico de la capsaicina es mas marcado que el efecto citotóxico.

G L O S A R I O

II. G L O S A R I O

DL 50	Dosis letal 50 %
DMS	Dimetil sulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
ENC	Eritrocitos normocrómicos
EPC	Eritrocitos policromáticos
EPC MN	Eritrocitos policromáticos micronucleados
ES	Error estándar
RNA	Acido ribonucleico

I N T R O D U C C I O N

III. INTRODUCCION

- Definición y antecedentes de la prueba de micronúcleos.

Diversos agentes como la Mitomicina C y la Colchicina, son capaces de causar daño citogenético en animales de experimentación, el potencial que estos poseen para causar efectos similares en el humano es obvio. El método clásico para valorar daño citogenético es el estudio de preparaciones de metafases de células tratadas con el agente de prueba tanto in vivo como in vitro. Como una alternativa al clásico análisis de metafases, se propuso contar la frecuencia de micronúcleos en células tratadas con un agente, lo cual proporciona una rápida comparación así como la indicación de aberraciones cromosómicas y pérdida de cromosomas que llevan a anomalías numéricas de éstos (Heddle y cols., 1983).

Los micronúcleos son una masa de cromatina citoplasmática con aspecto de núcleos pequeños que surgen de fragmentos de cromátidos o de cromosomas retrasados en anafase así como por clastógenos que tienen efecto sobre el huso acromático (Hayashi y cols., 1984). Figura 1

La existencia de micronúcleos ya ha sido reconocida durante muchos años; su asociación con daño cromosómico fue estudiada en trabajos del campo de la radiación en donde se menciona su frecuencia. El primer intento serio del uso de la frecuencia de micronúcleos como monitor de daño citogenético aparece reportado por Evans en 1959, él utilizó la frecuencia de micronúcleos como una medida de daño citogenético inducido en la punta de la raíz de las habas por neutrones rápidos y rayos gamma en presencia y ausencia de oxígeno, encontrando que los cromátidos, cromosomas e isocromátidos rotos, así como también cambios asimétricos y simétricos incompletos dan origen a la aparición de fragmentos acéntricos en la mitosis, y estos fragmentos son excluidos del núcleo principal apareciendo en la siguiente interfase como micronúcleos. Evans y cols., estimaron incluso que la frecuencia de micronúcleos en células recién formadas después de la irradiación fue de aproximadamente 60 % de la frecuencia de fragmentos observados en preparaciones de metafases de células tratadas en forma similar (Evans y cols., 1959).

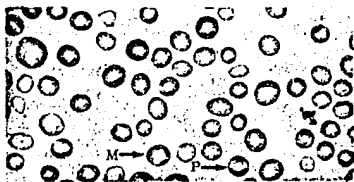


FIGURA 1: FROTIS DE SANGRE PERIFERICA QUE
MUESTRA A LOS MICRONUCLEOS (M)
Y A LOS EPC (P).

En un estudio in vitro, Countryman y Heddle, explicaron que los aspectos de correlación de las células micronucleadas correspondían con los esperados del análisis de metafases para aberraciones en linfocitos humanos cultivados e irradiados con rayos X (Countryman y Heddle, 1976).

Fue en los años de 1966 y 1970 cuando Schroeder recomendó el uso de frotis de médula ósea para detectar daño in vivo de mutágenos químicos, demostrando la presencia de micronúcleos en las células de dicha médula en relación con daño citogenético (Heddle y cols, 1983).

Aproximadamente a principios de 1970, Schmid y cols, así como Heddle iniciaron estudios para determinar que parámetros podían servir como los más útiles indicadores de daño citogenético en médula ósea in vivo. Este trabajo condujo a la conclusión de que la incidencia de EPC micronucleados era particularmente un índice útil de daño citogenético de médula ósea in vivo (Von Ledebur y Schmid, 1973). Otros investigadores también comenzaron a utilizar a los micronúcleos en estudios citogenéticos, pero solo el trabajo de Von Ledebur y Schmid es de importancia histórica porque condujo directamente al desarrollo de la prueba in vivo basada en la identificación de micronúcleos en los EPC de médula ósea de ratón. Este ensayo en la actualidad es utilizado ampliamente y es comúnmente llamado "la prueba de micronúcleos" (Schmid, 1975).

En el año de 1980 MacGregor y cols, realizaron experimentos para observar la frecuencia de micronúcleos en sangre periférica y probar que ésta podría ser utilizada como un indicador de daño citogenético en eritroblastos (MacGregor y cols, 1980). Los resultados que se obtuvieron fueron que los eritrocitos micronucleados no son eliminados selectivamente de la circulación periférica del ratón (Schlegel y MacGregor, 1982) y se demostró que la incidencia de micronúcleos en sangre periférica es igual que la observada en médula ósea y que puede por lo tanto ser un índice útil de daño citogenético, por lo que en la actualidad la frecuencia de EPC micronucleados en sangre periférica es utilizada por numerosos investigadores (Schlegel y MacGregor, 1983 y 1984; Barale y cols, 1985; Choy y cols, 1985; Luke y cols, 1988).

- Importancia del estudio de los micronúcleos y sistemas de ensayo.

La posibilidad de que algunos aditivos de alimentos, medicamentos u otros compuestos químicos a los que la gente está expuesta sean genotóxicos es una cuestión de interés general (Heddle, 1973) ya que implica un daño al DNA, esto indica que una lesión sobre este podría tener algún efecto sobre la progenie de las células. El daño al DNA parece relacionarse de alguna manera a la carcinogenicidad de químicos particulares, aunque no todas las formas de enlace al DNA tienen un efecto similar. Sin embargo, el aparente paralelismo entre eventos de genotoxicidad en microorganismos y células de mamífero con la carcinogénesis animal es hasta el momento muy impreciso (Clayson, 1980). Considerando lo anterior se dice que una incorrecta detección de un químico designado como carcinogénico es cercana al 50 % (Heddle y cols, 1983).

Para la detección de compuestos genotóxicos existen diversas técnicas in vivo e in vitro, y entre éstas tenemos a la técnica llamada de micronúcleos. El aumento de ensayos de micronúcleos desde 1973 indudablemente sirvieron principalmente para detectar las primeras ventajas de este estudio, como son: rapidez y simplicidad. Heddle puntualizó que se destaca el conteo de micronúcleos ya que es considerablemente diez veces más rápido que el conteo de metafases con un poder similar de prueba. Sin embargo rapidez y simplicidad no son las únicas ventajas de la prueba que Heddle y otros han observado, ya que entre otras se encuentran las siguientes (Heddle y cols, 1973 y 1983):

- 1.- Los micronúcleos pueden ser observados durante todo el ciclo celular, y el número de células contables es relativamente ilimitado.
- 2.- El parámetro contado es reconocido fácilmente hasta por personal con poca experiencia en citogenética.
- 3.- No se requiere de un cariotipo favorable.
- 4.- El micronúcleo formado durante la división celular persiste al menos a través de la siguiente interfase de modo que el tiempo de muestreo es menos crítico.

5.- No se requiere el uso de algún otro agente químico además de aquel que está bajo prueba, como por ejemplo, agentes huso bloqueadores necesarios en otras técnicas citogenéticas.

6.- La significancia de micronúcleos es comparativamente clara. Ciertos problemas inevitables asociados con la interpretación de otras pruebas citogenéticas, tal como los gaps cromosómicos (espacios intramoleculares en el DNA) o intercambios de cromátides hermanas en esta prueba de micronúcleos no se tienen.

7.- Los cromosomas rezagados en anafase por un daño al huso acromático son detectados fácilmente en la prueba de micronúcleos.

La principal limitación del uso de micronúcleos para identificar daño citogenético es que no son detectados los agentes que ni rompen cromosomas ni causan rezago anafásico. Así, mientras que los cromosomas perdidos debido a fallas cromosómicas asociadas con el huso acromático son detectadas, la inadecuada distribución de los cromosomas debida a que los mecanismos no disyuncionales en los cuales los cromosomas están normalmente asociados con el huso acromático no serían detectados. Las aberraciones que implican rearrreglos cromosómicos fuera de la ocurrencia de un fragmento acéntrico tal como una translocación o una inversión no serán detectados. Aunque no es una seria limitación para el propósito del examen, la mecánica de la información obtenida de las mediciones de los micronúcleos es más limitada que la obtenida de análisis de metafases.

Es difícil, tan sólo sobre las bases de frecuencia de micronúcleos, distinguir efectos clastogénicos, de pérdidas cromosómicas y de daño al huso acromático. El tiempo de respuesta (Schmid, 1976), contenido de DNA (Heddle y Carrano, 1977), y el tamaño de micronúcleos (Yamamoto y Kikuchi, 1980) permiten hacer esta distinción.

Las limitaciones que no dependen del carácter genético de los eventos medidos, pero los cuales están relacionados a características numéricas del diseño experimental o a consideraciones farmacocinéticas (por ejemplo, acceso del componente activado a la población celular particular elegida para el estudio, elección de los niveles de dosis y tiempos de muestreo) son características que dependen del sistema individual de prueba empleado (Heddle y cols, 1983).

Entre los sistemas de prueba empleados se incluyen, EPC de roedores (ratón, rata y hámster chino), monos, etc. Para toda práctica propuesta el sistema en médula ósea era la única prueba de micronúcleos validada adecuadamente (Heddle, 1973). Sin embargo la presencia de micronúcleos ha sido empleada como una medida de rompimiento cromosómico en una variedad de tejidos y tipos de organismos, por ejemplo: células en cultivo; tejidos de plantas; tejidos de gente afectada con un daño particular, como los síndromes con rompimiento cromosómico; o de pacientes tratados con diversos agentes citotóxicos. El uso de células en cultivo evita el problema de que los agentes probados o sus metabolitos no alcancen la médula ósea, ya que las células pueden ser expuestas al agente de manera directa; por otro lado, se pierde la ventaja de la activación in vivo. A la fecha los tejidos más comúnmente empleados para estudios in vitro han sido linfocitos humanos cultivados de sangre completa. Otras fuentes de tejido que han sido utilizadas incluyen: fibroblastos ováricos de hámster chino, células tumorales ováricas de canguro, y células de carcinoma Walker-256.

Un limitado número de plantas han sido probadas para daño genético expresado como micronúcleos. Estas incluyen: haba, tradescantia y perla mijo. El tejido de la punta de la raíz o de la espiga es generalmente examinado para micronúcleos por periodos superiores a 72 horas después de la exposición a la substancia de prueba (Heddle y cols, 1983).

La prueba utilizada para la detección de micronúcleos en humano difiere muy poco de la prueba estándar de micronúcleos usada con roedores. Sin embargo, con humanos ésta ha sido utilizada primordialmente como herramienta de investigación para valorar la condición existente de individuos que tienen un alto riesgo de daño cromosómico. Aspirados de médula ósea han sido tomados de pacientes internados o quienes han recibido tratamientos químicos para una enfermedad en particular, o a individuos quienes tienen sin saberlo propensión a potencializar fármacos. La frecuencia de células eritroblásticas micronucleadas o EPC micronucleados fue comparada con las muestras de aspiraciones tomadas de médula ósea de individuos sanos o no tratados.

Los individuos afectados con síndromes que causen rompimientos cromosómicos son sospechosos de tener una alta incidencia de micronúcleos, los cuales pueden ser detectados utilizando aspirados de médula ósea a cualquier tiempo.

Con respecto a la prueba de EPC en roedores, los eritrocitos micronucleados de médula ósea han sido reconocidos como indicadores de daño citogenético agudo (Schmid, 1976; Heddle, 1973), ya que unas pocas horas después de la terminación de la mitosis, los eritroblastos expulsan el núcleo principal de ellos, pero por razones hasta hoy desconocidas, los micronúcleos permanecen en el citoplasma del eritrocito joven (policromático) siendo reconocidos fácilmente (Schmid, 1975; Hayashi y cols, 1984). Figura 2

Hasta hace poco se creyó que los clastógenos de médula ósea, no incrementaban la frecuencia de eritrocitos micronucleados en sangre periférica ya que el bazo se encargaría de eliminar a estas células anormales (Von Ledebur y Schmid, 1973). Lo contrario se ha demostrado recientemente en ratones por medio de tratamientos agudos con clastógenos de médula ósea, con los cuales, se incrementó la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de sangre periférica, resultando frecuencias aproximadamente iguales a las obtenidas con dicho método (Barale y cols, 1985).

La prueba de micronúcleos en sangre periférica tiene un número mayor de ventajas que la realizada en médula ósea, ya que una pequeña gota de sangre proporciona miles de células contables, repetidas muestras pueden ser obtenidas fácilmente de un mismo animal, evitando la necesidad de sacrificarlo. La única preparación necesaria consiste en un frotis directamente de sangre. La remoción del hueso, suspensión de la médula y centrifugación de las células, los cuales son necesarios para el examen de células de médula ósea, en sangre periférica son innecesarias.

También es más fácil el conteo en preparaciones de sangre periférica que en las de médula ósea. Los micronúcleos son de fácil distinción porque ellos son los únicos teñidos con rasgos oscuros sobre la laminilla. Hay también menos cantidad de material basofílico extraño sobre la laminilla que en el caso de médula ósea. Esto también facilita el conteo, especialmente en especies con muchas células de la serie granulocítica basófila (MacGregor y cols, 1980; Schlegel y MacGregor, 1982). Barale y cols, sugieren que no ocurre una eliminación selectiva por el bazo de eritrocitos micronucleados (Barale y cols, 1985).

Algunos compuestos genotóxicos como la mostaza nitrogenada y la ciclofosfamida han sido probados hasta ahora con resultados positivos y alentadores, sugiriendo el uso de esta metodología para el análisis de compuestos ambientales

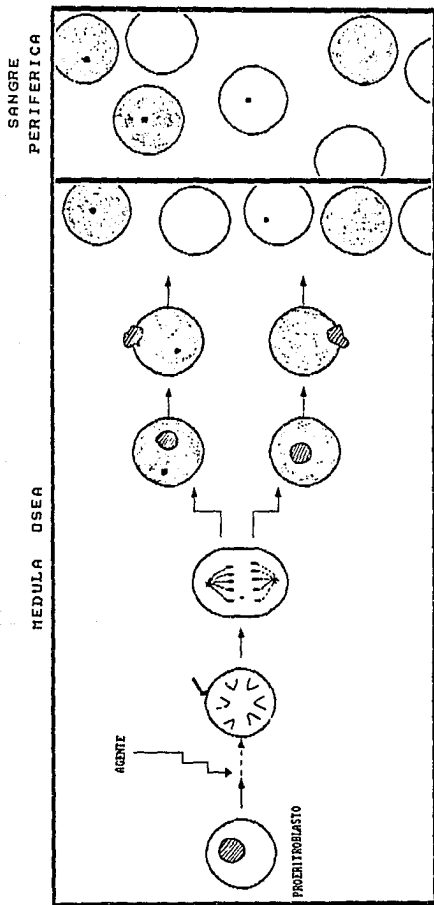


FIGURA 2: FORMACION DE ERITROCITOS MICRONUCLEADOS EN SANGRE PERIFERICA.

probados crónicamente. La frecuencia de células micronucleadas en sangre periférica puede ser un indicador sensible de daño cromosómico que provee una medida directa de genotoxicidad en ratones sometidos a bioensayos de carcinogenicidad (Schlegel y MacGregor, 1982 y 1983; Choy y cols, 1985).

Además de la implementación de la prueba en sangre periférica han habido otros avances recientes con respecto a la prueba de micronúcleos, como por ejemplo, la prueba transplacentaria de micronúcleos (Cole y cols, 1979 y 1981) cuya importancia radica en la habilidad para detectar compuestos gerotóxicos que pueden afectar al feto.

Otro avance consiste en la medición simultánea de micronúcleos e intercambios de cromátides hermanas (Henderson y cols, 1984). En 1980 Raj y Heddle, reportaron resultados obtenidos del conteo de micronúcleos sobre laminillas hachas para el conteo de intercambios de cromátides hermanas. Para un restringido número de químicos, la sensibilidad de los dos ensayos son simultáneamente parecidas. Puesto que los intercambios de cromátides hermanas y los micronúcleos no son producidos siempre juntos, el ensayo combinado tendría una muy alta proporción de confiabilidad que cualquiera de los dos por separado. Se requiere de mas experiencia para determinar si el trabajo extra de conteo para ambos eventos es justificado.

Otro avance es la prueba de micronúcleos en hígado. Tates y cols, han estimulado la división celular del hígado por hepatectomía parcial (las células del hígado en un adulto normal raramente se dividen), expusieron estas células a los carcinógenos del hígado, dietil y dimetilnitrosamina y las examinaron para micronúcleos. En ambos casos los resultados fueron positivos, pero como cualquier nueva técnica se requiere experiencia antes de que todas las ventajas y desventajas queden evidentes y los méritos relativos puedan ser juzgados adecuadamente (Heddle y cols, 1983).

- Formación de micronúcleos y compuestos inductores.

El método de micronúcleos se basa en los principios y observaciones siguientes: en anafase, las cromátidas acéntricas y fragmentos cromosómicos se rezagan cuando los elementos céntricos se mueven hacia los ejes polares. Después de la telofase los cromosomas intactos, así como también los fragmentos céntricos, dan surgimiento a un núcleo regular hijo, los elementos rezagados son incluidos en las células hijas, así mismo, sólo una proporción considerable es transformada en uno o varios núcleos secundarios los cuales son mucho más pequeños que el núcleo principal y son por consiguiente llamados micronúcleos.

Eventos similares ocurren en el funcionamiento del huso acromático dañado, sin embargo en este caso el núcleo principal es a menudo reemplazado por todo un grupo de núcleos pequeños, el cual en general es considerablemente más grande que un micronúcleo típico. (Schmid, 1975).

De acuerdo a los trabajos reportados acerca de la prueba de micronúcleos podemos clasificar a los agentes inductores de micronúcleos de la siguiente manera:

1.- Fragmentadores cromosómicos.

Dentro de estos encontramos a:

a) Los agentes S dependientes (actúan durante la replicación del DNA) como algunos compuestos alquilantes, los cuales adicionan grupos metilo o etilo a la guanina haciendo que se comporte como un análogo de base de la adenina; o causando la pérdida de las bases alquiladas de guanina, por ejemplo: Metil-metano-sulfonato, Dimetil nitrosamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Jenssen y Ramel, 1978).

b) Los agentes S independientes (actúan en cualquier fase del ciclo celular). Por ejemplo: Los rayos X, los cuales producen radicales libres que atacan al DNA rompiéndolo (Jenssen y Ramel, 1978).

2.- Inhibidores del huso acromático.

Por ejemplo: Metil bencimidazol-2-il-carbamato, el cual inhibe la función del huso (Seiler, 1976); colchicina, vincristina y vinblastina, los cuales inhiben la síntesis de proteína para la formación del huso (Maier y Schmid, 1976; Bruce y Heddle, 1979; Tsuchimoto y Matter, 1979, Jenssen y Ramel, 1978; Hayashi y cols, 1982; Hart y Engberg-Pedersen, 1983; Gloria y Castro, 1985).

- Propiedades fisicoquímicas y efectos farmacológicos de la capsaicina.

La capsaicina es el principio picante y el constituyente más importante del fruto del chile (*capsicum*), el cual se cultiva en muchas partes del mundo, como en el sur de la India, Latinoamérica y en Africa (Wallis, 1966); los principales usos de éste fruto y su principio picante son: como condimento para alimentos, administrada internamente en la dispepsia atónica y en la flatulencia, y externamente se administra en forma de pomada para aliviar el reumatismo, lumbago, etc (Trease-Evans, 1984).

La capsaicina fue aislada por primera vez en 1876 por Thresh, mediante una extracción con petróleo y cuyo extracto trató con álcali acuoso a base de dióxido de carbono, logrando así precipitar cristales del compuesto intensamente picante (Wallis, 1966; Trease-Evans, 1984).

Los frutos de *capsicum* contienen alrededor de 0.1 a 1.0 % de capsaicina dependiendo de la variedad que se trate (Nopanitaya y Nye, 1974; Glinsukon y cols, 1980; Monsereenusorn y cols, 1982; Index Merck, 1983; Nagabhushan y Bhide, 1985). Tabla 1

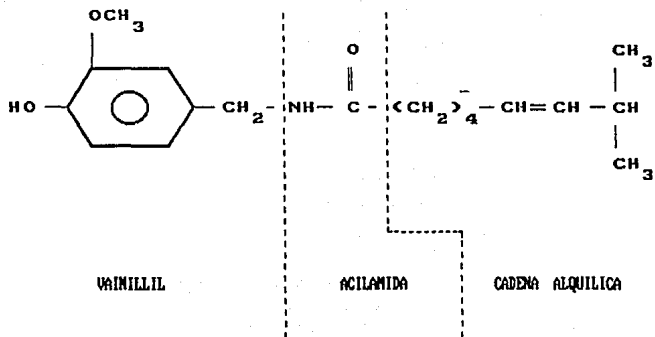
La capsaicina presenta aspecto de plaquetas incoloras, las cuales tienen un intenso sabor quemante (umbral aproximado, 10 ppm), funde entre 63 y 65°C y tiene un punto de ebullición entre los 210 y 220°C. Es insoluble en agua fría y soluble en disolventes orgánicos tales como: benceno, alcohol, éter, dimetil sulfóxido, ácido acético glacial, etc. La capsaicina tiene una absorción máxima en ultravioleta a 227 y 281 nm (Monsereenusorn y cols, 1982; Index Merck, 1983). Es un ácido débil con un grupo fenol, el cual no es precipitado por los reactivos utilizados para precipitar alcaloides. La propiedad picante no se afecta por calentamiento con solución de hidróxido de sodio al 2 %, pero se destruye por la oxidación con dicromato o permanganato de potasio. Nelson y Dawson en 1923 dieron a conocer la fórmula estructural de la capsaicina que es la amida vainillílica del ácido isodecenoico y cuya fórmula empírica es $C_{18}H_{27}NO_3$, con un peso molecular de 305.40 daltons (Monsereenusorn y cols, 1982; Index Merck, 1983; Barcelo, 1982). Figura 3

Se ha demostrado en diversos estudios que la capsaicina ejerce muchas acciones en varias funciones del cuerpo, como las que a continuación se mencionan:

**TABLA 1: CONTENIDO DE CAPSAICINA EN DIFERENTES
 VARIEDADES DE CAPSICUM.**

VARIEDAD	CONCENTRACION	
C. minimum	1.82 mg/g*	0.182 %
C. annua	1.67 mg/g*	0.167 %
C. frutescens	0.45 mg/g*	0.045 %

* peso seco



**FIGURA 3: ESTRUCTURA QUIMICA DE LA CAPSAICINA
(8-METIL-N-VAINILLIL-6-NOENAMIDA).**

a) Efectos cardiovasculares y respiratorios.

Bevan en 1962, Coleridge en 1965, Makara en 1967 y otros investigadores han reportado que cuando administraron intravenosamente capsaicina a gatos y perros se produjeron una triada de efectos consistentes en: bradicardia, disminución de la presión cardiaca y apnea. La intensidad de estas acciones fue en proporción directa a la cantidad de capsaicina administrada (Toda y cols, 1972; Monsereenusorn y cols, 1982).

b) Efectos sobre la termorregulación.

Hogyes en 1878, fue el primero que observó la característica de sensación quemante producida por *Capsicum annum* mediante inyecciones subcutáneas o por aplicación a membranas mucosas. Issekutz y cols, en 1950 citaron un inédito hallazgo al observar que la administración oral de capsaicina a conejos resultó en un considerable decremento de la temperatura rectal. Lee en 1954, reportó que provoca sudoración de la frente cuando es aplicada en la membrana mucosa de la boca. Al administrarse en dosis bajas (1.4 mg/kg de peso corporal) por vía subcutánea en ratones, se observó una disminución de la temperatura rectal de 36.6°C a un mínimo de 30.5°C durante 30 minutos, interpretándose con esto que la capsaicina excita a los receptores del calor que activan el centro de calentamiento en el hipotálamo; sin embargo a altas dosis (65 mg/kg de peso) se induce a una desensibilización del centro hipotalámico y de los receptores del calor, ya que la hipotermia no se lleva a cabo (Monsereenusorn y cols, 1982).

c) Efectos sobre el dolor y la desensibilización.

La capsaicina causa severos dolores e irritación cuando es aplicada sobre la piel o las membranas mucosas, el efecto de dolor es ejercido por estimulación de fibras no mielinizadas, las cuales son sensibilizadas por estímulos térmicos (Szolcsanyi, 1977).

Se sabe por las investigaciones de Jancso y cols, que después de la aplicación parenteral o local de progresivas dosis de capsaicina los animales desarrollan una peculiar analgesia a una amplia variedad de estímulos químicos, por ejemplo a la inoculación de agentes irritantes como: cloruro de potasio 0.1 M y ácido clorhídrico 0.1 M, por lo cual, los nervios sensoriales terminan por quedar completamente insensibles a estímulos químicos y no obstante quedan

sensibles a dolor térmico, dolor físico y estímulos profundos de receptores quimionociceptivos (Faulkner y Growcott, 1980; Hayes y cols, 1981). Con respecto al dolor físico por estímulos mecánicos Faulkner y Growcott encontraron que la capsaicina incrementa el umbral nociceptivo mediante pruebas de presión en las patas, pruebas sobre plato caliente y pruebas de inmersión de cola.

La recuperación de esta desensibilización general es paulatina y no es completa hasta después de 60 días (Jancso-Gabor y cols, 1970; Monsereenusorn y cols, 1982).

d) Efectos gastrointestinales.

Feng en 1929 observó que al dar una solución de capsicum por vía oral a perros y humanos producía un abundante flujo de saliva y un pequeño incremento de secreción gástrica. Sin embargo no se afectan otras funciones digestivas, tales como: secreciones pancreáticas o biliares, o movimientos gástricos e intestinales. En ratas fue observado el efecto potenciador de la capsaicina administrada intragástricamente sobre reserpina para producir ulceración gástrica (Makara y cols, 1965). Las razones por las que la acción de la capsaicina es promotor de úlceras no son claramente entendidas por lo que se han sugerido diversas posibilidades para explicar este fenómeno:

1.- La capsaicina posiblemente excita quimiorreceptores duodenales y, por acción refleja estimula la secreción gástrica (Makara y cols, 1965).

2.- La capsaicina posiblemente actúa por debajo de la barrera mucosa del estómago destruyéndola (Desai y cols, 1977).

3.- La capsaicina tal vez, estimula a los receptores H_2 de histamina en el estómago, incrementando con esto la secreción gástrica (Mann, 1977).

4.- La capsaicina posiblemente estimula el control vagal de secreción gástrica, el cual induce a la liberación de gastrina y acetil colina (Tongyai, 1977).

Nopanitaya y Nye en 1974, observaron daño a las células de la mucosa duodenal después de la administración intragástrica de una solución de capsicum al 10 % (p/v). Los cambios morfológicos celulares incluyen: crecimiento de la

mitocondria, con una matriz rara y crestas desorganizadas, un incremento en el número de ribosomas y lisosomas libres, dilatación del retículo endoplásmico y aparato de Golgi, y núcleo contraído con cromatina marginada en la membrana nuclear (Nopanitaya y Nye, 1974).

Recientemente se estableció que la capsaicina es absorbida por el intestino, y posiblemente por influencia de la ATPasa Na⁺-K⁺ que activa el metabolismo intestinal (Monserreenusorn y Glinsukon, 1979).

En periodos de ingestión crónica, Lee (1963) reportó que 5.0 g/kg de pimentón diariamente acompañados de una dieta alta en grasa por un periodo de 6 meses, intensificó severamente el daño a hígado y riñón de conejo. Se estableció cirrosis en la mayor parte del hígado.

En un intento para explicar el estado diarreico asociado con la ingestión de capsicum, Tupjan tiene establecido un efecto inhibitorio de la capsaicina sobre la contracción del colon en rata. Anuras y cols, demostraron que la capsaicina a una concentración de 3.05 mg/100g causaron una reducción significativa (45 %) de la frecuencia de las ondas lentas eléctricas en el colon (Anuras y cols, 1977; Monserreenusorn y cols, 1982). Presumiblemente, tal anomalía en la motilidad puede explicar la diarrea asociada con el consumo de grandes cantidades de chile (Valle, 1986).

- *La capsaicina y sus efectos tóxicos, genotóxicos y cancerígenos.*

Cabanac y cols, reportaron en un estudio de toxicidad aguda, que la capsaicina administrada subcutáneamente a ratas en cuatro dosis, aumentando la cantidad acumulativa de 21.0 a 66.0 mg/rata, provoca la muerte de 8 ratas en un lote de 17 (Cabanac y cols, 1976).

Glinsukon y cols, observaron en estudios de toxicidad aguda que la letalidad de la capsaicina varía dependiendo de la vía de administración. Así, al administrarse en ratones de 25 a 35 g por varias rutas, se obtuvieron resultados diferentes de DL 50 (Glinsukon y cols, 1980). Tabla 2

Las rutas dérmica y rectal fueron usadas para determinar si la actividad enzimática y/o el ácido gástrico pudieron haber contribuido a la disminución de la letalidad cuando la capsaicina fue administrada por vía intragástrica. Sin embargo, no se observaron signos tóxicos o muertes en ratones administrados por vía rectal o dérmica con dosis tan altas como 218 o 512 mg/kg respectivamente. Esto es probablemente atribuible a la insolubilidad de la capsaicina en solución acuosa pero no a la inestabilidad en solución ácida (Toh y cols, 1955).

Después de la administración de la capsaicina, las ratas quedan excitadas y convulsionadas aproximadamente uno o dos minutos. Al extender sus extremidades quedan disneicas y aparentemente muertas de falla respiratoria dentro de un tiempo entre dos a cinco minutos. Los supervivientes de una dosis alta de capsaicina, demostraron signos similares y recuperación en un tiempo de 30 a 60 minutos (Glinsukon y cols, 1980).

Sin embargo, el mecanismo por el cual la capsaicina actúa no es aún conocido, no obstante Glinsukon y cols, sugieren que la posible causa de muerte es parálisis respiratoria.

Nagabhushan y Bhide, en un estudio para probar la mutagenicidad de: capsaicina, extracto de chile y vainillina, utilizaron a *Salmonella typhimurium* (His-), encontrando que la vainillina no es mutagénica y que tanto la capsaicina como el extracto de chile son mutagénicos, mostrando más mutagenicidad la capsaicina. Realizaron un ensayo agudo de micronúcleos, administrando capsaicina en dos niveles de dosis, una cercana a la DL 50 (7.5 mg/kg) y otra de 1/4 de la

TABLA 2: LETALIDAD RELATIVA DE CAPSAICINA DISUELTA EN DMS CUNADO ES ADMINISTRADA POR VARIAS RUTAS EN RATONES MACHO (25-35 g).

RUTA DE ADMINISTRACION	DL 50 (mg/kg)
INTRAVENOSA	0.56
INTRATRAQUEAL	1.60
INTRAPERITONEAL	7.65
INTRAMUSCULAR	7.80
SUBCUTANEA	9.00
INTRAGASTRICA	190.0
INTRARECTAL	> 218
DERMICA	> 512

DL 50 (1.8 mg/kg), así como extracto de chile a ratones Swiss.

Encontraron que el tratamiento con 1.8 mg/kg no indujo aumento en la frecuencia de micronúcleos al compararse con un grupo no tratado. Sin embargo con la dosis cercana a la DL 50 (7.5 mg/kg), la capsaicina indujo un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos. Los extractos de chile a una dosis de 146.4 mg/kg, no indujeron un aumento en la frecuencia de micronúcleos.

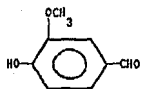
Tanto la vainillina como la capsaicina poseen el radical vainillil, el cual no es el causante de la producción de daño mutagénico, ya que la vainillina que carece de cadena alquílica se demostró que no es mutagénica; indicándose con esto que la cadena alquílica de la capsaicina tiene un importante papel en la mutagenicidad (Nagabhushan y Bhide, 1985).

Nakamura y Yamamoto en 1983, atribuyeron una diferencia en la mutagenicidad de diferentes cadenas alquílicas de dos compuestos químicos: (6)-gingerol y (6)-Shogaol, que tienen estructuras similares a la capsaicina (Nakamura y Yamamoto, 1983). Figura 4

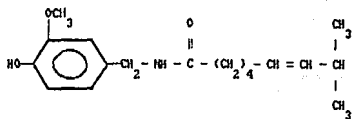
Se sabe que factores dietéticos juegan un importante papel en el desarrollo de cáncer (Alcantara y Speckmann, 1976; Tanenbaum y Silverstone, 1953). Esta observación es soportada por estudios epidemiológicos sobre poblaciones inmigrantes de diferentes partes del mundo y por estudios en animales.

Diferentes especies utilizadas rutinariamente en la preparación de alimentos son sospechosas de modular la ocurrencia de tumores orales. Los principales sospechosos entre estas especies son los chiles, comúnmente usados en la India como ingredientes para los alimentos, y en donde la incidencia del cáncer en la cavidad orofaríngea es del 40 % del total de cáncer.

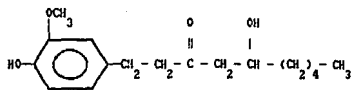
Se ha reportado que los chiles actúan como promotores en hepatocarcinogénesis (Adamuya, 1971). Nagabhushan y Bhide, observaron un efecto promotor del extracto de chile sobre hexacloruro de benceno que indujo hepatocarcinogénesis (Nagabhushan y Bhide, 1985). Los chiles también están reportados como productores de hepatomas (Hochligatti, 1951) cuando se consumen en un 10 % de la dieta. En adición, los chiles y la capsaicina producen cirrosis hepática



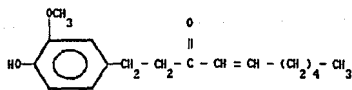
VAINILINA



CAPSAICINA



(6)-GINGEROL



(6)-SHOGAOL

FIGURA 4: ESTRUCTURAS QUIMICAS DE: VAINILINA, CAPSAICINA, (6)-GINGEROL Y (6)-SHOGAOL.

(Monsereenusorn y cols, 1982), daño a la mucosa duodenal (Nopanitaya y Nye, 1974) y úlceras gástricas (Schneider y cols, 1956), lo cual puede desarrollar un carcinoma intramucosal del estómago.

H I P O T E S I S
Y
O B J E T I V O S

IV. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS:

- La capsaicina induce la formación de EPC MN en sangre periférica de ratón.

OBJETIVO PRIMARIO:

- Determinar si la administración subaguda intraperitoneal de capsaicina a ratones macho jóvenes de la cepa NIH puede inducir la formación significativa de micronúcleos en EPC de sangre periférica.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- Determinar si ambas dosis de capsaicina administradas en el presente estudio aumentan la frecuencia de EPC MN.

- Determinar en que días, durante la administración de capsaicina hay un aumento significativo en la frecuencia de EPC MN.

- Establecer si la administración de capsaicina en ambas dosis produce alguna modificación significativa en la relación porcentual entre células policromáticas con respecto a normocromáticas.

M A T E R I A L
Y
M E T O D O S

V. MATERIAL Y METODOS

A) Material.

- *Material biológico:*

Se utilizaron 46 ratones macho de 25 +/- 3 g de peso y de 5 a 7 semanas de edad, de la cepa NIH, procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Higiene de la Secretaría de Salud, los cuales fueron mantenidos con alimento y agua ad libitum antes y durante el experimento y adaptados a las condiciones del laboratorio.

- *Soluciones administradas a los ratones:*

a) Solución de DMS-agua destilada en una proporción 1:5 v/v para ser administrada por vía intraperitoneal (0.5 ml de solución por cada 30 g de peso).

b) Capsaicina (Sigma Chemicals) disuelta en una solución de DMS al 20 % en 10 dosis: 1.46 mg/kg, 1.94 mg/kg, 2.92 mg/kg, 5.00 mg/kg, 5.83 mg/kg, 10.0 mg/kg, 20.0 mg/kg, 40.0 mg/kg, 100.0 mg/kg y 1000 mg/kg. para ser administradas por vía intraperitoneal (0.5 ml de solución por cada 30 g de peso).

B) Métodos.

- *Procedimiento previo al estudio de Micronúcleos:*

a) Determinación de la dosis letal 50 (DL 50) intraperitoneal de capsaicina para los ratones de la cepa NIH, según el esquema propuesto por Dietrich Lorke (Lorke, 1983).

Se distribuyeron inicialmente 9 ratones en 3 lotes y se les administraron las siguientes dosis de capsaicina: 10 mg/kg, 100 mg/kg y 1000 mg/kg.

Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

DOSIS ADMINISTRADA	MORTALIDAD / NO. RATONES UTILIZADOS
10 mg/kg	1 / 3
100 mg/kg	3 / 3
1000 mg/kg	3 / 3

De acuerdo a los resultados anteriores se administró capsaicina en las siguientes dosis: 5.0 mg/kg, 10.0 mg/kg, 20.0 mg/kg y 40.0 mg/kg, utilizando solamente un ratón por dosis, obteniéndose los resultados siguientes:

DOSIS ADMINISTRADA	MORTALIDAD / NO. RATONES UTILIZADOS
5.0 mg/kg	0 / 1
10.0 mg/kg	0 / 1
20.0 mg/kg	0 / 1
40.0 mg/kg	1 / 1

La media geométrica entre las dosis en donde los resultados fueron 0/1 y 1/1 es la DL 50 estimada, que en nuestro caso fue de 28.28 mg/kg.

b) Determinación de la dosis subaguda de capsaicina intraperitoneal que resisten los ratones de la cepa NIH durante un periodo mínimo de exposición de 32 días.

Se distribuyeron 15 ratones en 3 lotes. Las dosis propuestas probadas de capsaicina en estos lotes fueron: 1/5, 1/10 y 1/15 de la DL 50, obteniéndose que la dosis máxima que resistieron los ratones fue de 1.94 mg/kg que corresponde aproximadamente a 1/15 de la DL 50. Figura 5

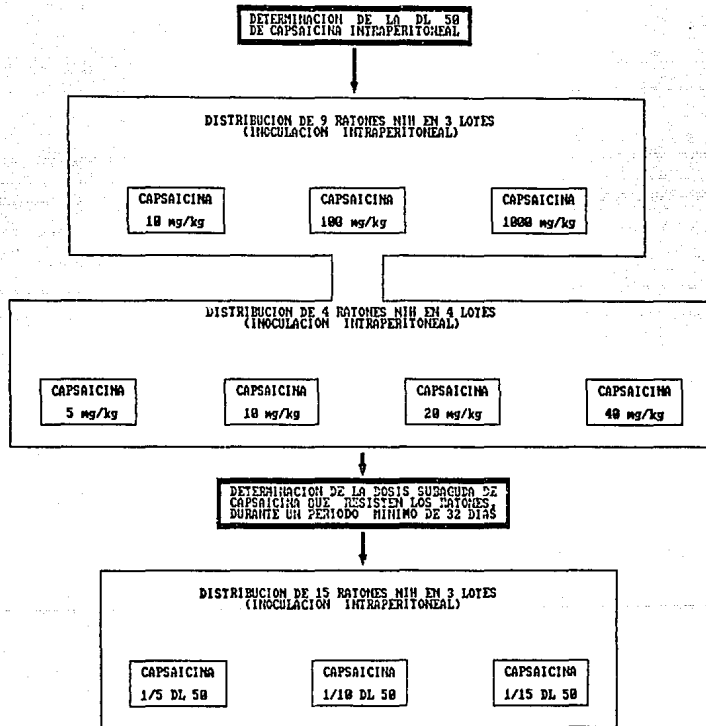


FIGURA 5: DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO
PREVIO AL ESTUDIO DE MICRONUCLEOS.

- Procedimiento para el estudio de micronúcleos en EPC de sangre periférica:

Se utilizaron 18 ratones, los cuales se distribuyeron en tres lotes. Los animales fueron inoculados durante 32 días a intervalos de 3 días por uno de descanso por vía intraperitoneal con el volumen de solución de acuerdo a su peso (0.5 ml de solución por cada 30 g de peso).

Los lotes fueron designados de la siguiente manera:

LOTE	SOLUCION ADMINISTRADA
A	DMS-Agua destilada 1/5 (v/v) (lote testigo)
B	1.46 mg/kg de capsaicina, correspondiente a 1/20 de la DL 50 aproximadamente.
C	1.94 mg/kg de capsaicina, correspondiente a 1/15 de la DL 50 aproximadamente.

Durante todo el tratamiento la toma de muestra se realizó cada octavo día, obteniéndose sangre periférica mediante un corte transversal de cola (Luke y cols, 1988), en cantidad suficiente para hacer tres frótis de cada ratón.

Una vez realizadas las laminillas se secaron al aire y se fijaron de inmediato durante aproximadamente 60 segundos en alcohol metílico absoluto, secándose nuevamente al aire para posteriormente proceder a tefirlas con el colorante de Giemsa durante aproximadamente 25 minutos (MacGregor y col, 1980; Schlegel y col, 1983; Luke y cols, 1988). Después de transcurrido este tiempo de tinción se enjuagaron las laminillas al chorro de agua para eliminar el exceso de colorante. Se utilizó Giemsa ya que la afinidad química o selectiva que posee nos permite la visualización clara de las células así como de los micronúcleos contenidos en ellas. Los eritrocitos policromáticos conservan sus ribosomas después de la enucleación tificándose de color azul (basofílicos) y los

eritrocitos normocrómicos se tiñen de color rojizo (acidofílicos) (Heddle y cols, 1983). Figura 6

Los colorantes básicos son sales en las que la base es coloreada y el ácido incoloro. Los colorantes ácidos son sales en las que el ácido es coloreado y la base incolora. Giemsa es un colorante que combina dos sales coloreadas (colorante neutro): la eosina como colorante ácido con afinidad hacia el citoplasma, y el azur II como colorante básico con afinidad hacia los ácidos nucleicos (Gaviño, 1982).

- *Análisis Estadístico.*

En este estudio se analizaron dos parámetros:

1) la frecuencia de micronúcleos en EPC y 2) la proporción de EPC con respecto a los ENC.

Para analizar los frotis se siguieron los criterios de Schmid. Las laminillas obtenidas fueron analizadas primero a 40 X por regiones en donde las células estuvieron bien separadas, intactas y perfectamente teñidas. Estas regiones fueron localizadas normalmente en la zona cerrada al final del frotis, la perfecta morfología de las células nucleadas sirvió como buen criterio de calificación. Posteriormente las laminillas fueron observadas con objetivo de inmersión, el tñido de las células fue rojo en eritrocitos maduros (normocrómicos) y azulado para las formas inmaduras (policromáticos). Los micronúcleos en los EPC se presentan como cuerpos de inclusión de color azul-violeta (Hart y col, 1993), son redondos con un diámetro aproximado de 1/20 a 1/15 del eritrocito y generalmente las células micronucleadas contienen un solo micronúcleo (Schmid, 1975). Los elementos contados son las células micronucleadas y no el número de micronúcleos (Luke y cols, 1980). El procedimiento de rutina consistió en la evaluación de 1000 EPC por animal por cada toma de muestra (Schlegel y col, 1982) y la frecuencia de EPC micronucleados se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{FRECUENCIA DE EPC MN} = \frac{\text{EPC MN} \times 1000}{\text{EPC CONTADOS}}$$

El segundo parámetro que se analizó fue la proporción de EPC para lo cual se contaron 1000 células por cada ratón en cada toma de muestra (Schlegel y col, 1982; Hayashi y cols, 1984; Barale y cols, 1985; Luke y cols, 1988). La proporción se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ EPC} = \frac{\text{EPC} \times 100}{\text{EPC} + \text{ENC}}$$

Ambos parámetros se analizaron estadísticamente por medio de la prueba de "t" de Student con $\alpha = 1\%$.

R E S U L T A D O S

VI. RESULTADOS

En las tablas 3 y 4 se presentan los resultados de la frecuencia de EPC MN en sangre periférica de ratón. Como se puede observar con la menor dosis de capsaicina utilizada en nuestro estudio (1.46 mg/kg) existe un incremento paulatino de la frecuencia de micronúcleos con respecto al lote testigo durante el tratamiento, sin embargo este incremento fue significativo estadísticamente (prueba de "t" de Student con $\alpha = 1\%$) hasta el día número 32.

Con la mayor dosis de capsaicina (1.94 mg/kg) observamos que el aumento de la frecuencia de EPC MN con respecto al lote testigo es más marcado y estadísticamente significativo a partir del día número 16 del tratamiento. Con lo anterior podemos indicar que ambas dosis utilizadas son inductoras de micronúcleos.

La gráfica 1 nos muestra de manera más objetiva los resultados de las tablas 3 y 4, en donde se puede observar que efectivamente con la dosis menor de capsaicina el aumento de la frecuencia de EPC MN es progresivo y significativo hasta el día número 32. Con la mayor dosis el aumento progresivo de la frecuencia de EPC MN es más claro y estadísticamente significativo a partir del día número 16.

TABLA 3: FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS EN ERITROCITOS POLICROMATICOS DE SANGRE PERIFERICA DE RATON. TRATAMIENTO INTRAPERITONEAL CON CAPSAICINA.

TRATAMIENTO DÍAS	No. DE ANIMALES	EPC MN / 1000 CELULAS +/- E.S.					
		DOSIS (mg/kg)					
		0.8		1.46			
8	12	0.6	+/-	0.33	0.5	+/-	0.22
8	12	0.8	+/-	0.40	1.7	+/-	0.49
16	12	0.5	+/-	0.34	1.8	+/-	0.40
24	12	0.5	+/-	0.22	2.0	+/-	0.63
32	12	0.5	+/-	0.22	*	3.7	+/- 0.56

LOS RESULTADOS REPRESENTAN PROMEDIOS OBTENIDOS DE 6000 CELULAS.

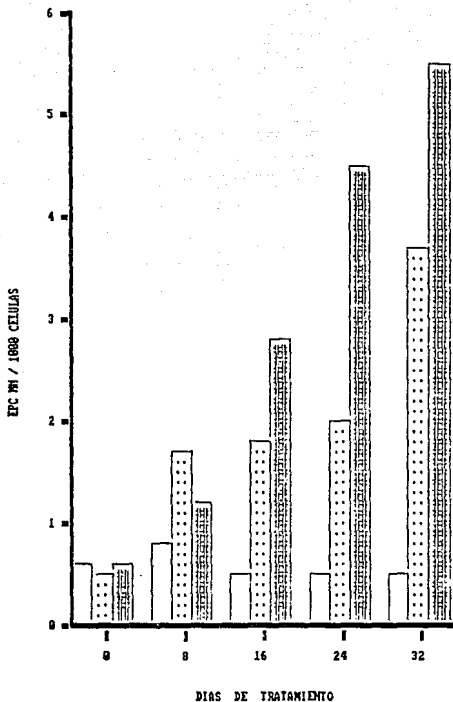
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA CON LA PRUEBA DE "t" DE STUDENT
CON $\alpha = 1\%$.

TABLA 4: FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS EN ERITROCITOS POLICROMATICOS DE SANGRE PERIFERICA DE RATON. TRATAMIENTO INTRAPERITONEAL CON CAPSAICINA.

TRATAMIENTO DIAS	No. DE ANIMALES	EPC MN / 1000 CELULAS +/- E.S.			
		DOSIS (mg/kg)			
		0.8		1.94	
8	12	0.6	+/-	0.33	0.6 +/- 0.21
8	12	0.8	+/-	0.40	1.2 +/- 0.31
16	12	0.5	+/-	0.34	* 2.8 +/- 0.60
24	12	0.5	+/-	0.22	* 4.5 +/- 0.67
32	12	0.5	+/-	0.22	* 5.5 +/- 0.56

LOS RESULTADOS REPRESENTAN PROMEDIOS OBTENIDOS DE 6000 CELULAS.

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA CON LA PRUEBA DE "t" DE STUDENT
CON $\alpha = 1\%$.



TESTIGO
 CAPSAICINA (1.46 mg/kg)
 CAPSAICINA (1.94 mg/kg)

GRAFICA 1: FRECUENCIA DE EPC MN DE SANGRE PERIFERICA DE RATON.

Las tablas 5 y 6 presentan los resultados de la relación de EPC con respecto a ENC en sangre periférica de ratón. En estas tablas observamos que con la menor dosis de capsaicina utilizada en nuestro estudio (1.46 mg/kg) no encontramos diferencias significativas estadísticamente con respecto al lote testigo durante todo el tratamiento. Sin embargo con la mayor dosis de capsaicina (1.94 mg/kg) el aumento en la relación de EPC con respecto a los ENC es claro y estadísticamente significativo a partir del día número 8 de tratamiento. Entonces podemos decir que la dosis menor no induce ninguna alteración en la relación de EPC con respecto a los ENC, no así la dosis mayor.

La gráfica 2 ilustra los resultados de las tablas 5 y 6 en donde se observa que con la dosis menor de capsaicina, la relación de EPC con respecto a los ENC tiende a ser constante y no muestra diferencia significativa con respecto al lote testigo, en tanto el lote con la mayor dosis de capsaicina presentó una tendencia progresiva de aumento en la relación de EPC con respecto a los ENC y significativa a partir del día ocho.

TABLA 5: FRECUENCIA DE ERITROCITOS POLICROMATICOS CON RESPECTO A ERITROCITOS NORMOCROMICOS EN SANGRE PERIFERICA DE RATON. TRATAMIENTO INTRAPERITONEAL CON CAPSAICINA.

TRATAMIENTO DIAS	No. DE ANIMALES	% EPC +/- E.S.	
		DOSIS (ng/kg)	
		0.8	1.46
0	12	3.7 +/- 0.19	3.5 +/- 0.07
8	12	3.2 +/- 0.18	3.1 +/- 0.22
16	12	3.4 +/- 0.44	3.5 +/- 0.22
24	12	4.8 +/- 0.20	4.2 +/- 0.26
32	12	3.3 +/- 0.18	3.9 +/- 0.31

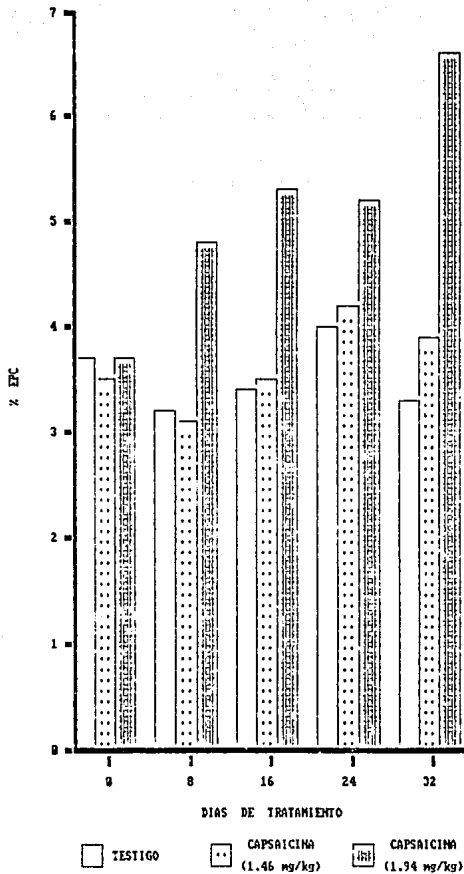
LOS RESULTADOS REPRESENTAN PROMEDIOS OBTENIDOS DE 6000 CELULAS.

TABLA 6: FRECUENCIA DE ERITROCITOS POLICROMATICOS CON RESPECTO A ERITROCITOS NORMOCROMICOS EN SANGRE PERIFERICA DE RATON. TRATAMIENTO INTRAPERITONEAL CON CAPSAICINA.

TRATAMIENTO DIAS	No. DE ANIMALES	% EPC +/- E.S.			
		DOSIS (mg/kg)			
		0.0		1.94	
0	12	3.7	+/- 0.19	3.7	+/- 0.23
8	12	3.2	+/- 0.18	* 4.8	+/- 0.48
16	12	3.4	+/- 0.44	* 5.3	+/- 0.76
24	12	4.0	+/- 0.20	* 5.2	+/- 0.53
32	12	3.3	+/- 0.18	* 6.6	+/- 0.65

LOS RESULTADOS REPRESENTAN PROMEDIOS OBTENIDOS DE 6000 CELULAS.

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA CON LA PRUEBA DE "t" DE STUDENT
CON $\leq 1\%$.



GRAFICA 2: PROPORCION DE EPC CON RESPECTO A DMC EN SANGRE PERIFERICA DE RATON.

D I S C U S S I O N

VII. DISCUSION

Las dosis de capsaicina utilizadas en nuestro estudio correspondieron aproximadamente a 1/20 (1.46 mg/kg) y a 1/15 (1.94 mg/kg) de la DL 50, dicho parámetro fue determinado por nosotros en la cepa de ratones NIH por vía intraperitoneal y corresponde a 28.28 mg/kg; ésta difiere de la reportada por Glinsukon y cols, quienes obtuvieron una DL 50 intraperitoneal para capsaicina en ratones Swiss de 7.6 mg/kg (Glinsukon y cols, 1980).

La diferencia entre las dosis letales mencionadas anteriormente puede atribuirse principalmente a: la cepa ensayada, peso de los animales, temperatura ambiental y condiciones de habitación de éstos. Lorke y Zbinden, afirmaron que la DL 50 no es una constante biológica y los resultados difieren con la repetición de la prueba o cuando ésta es realizada por diferentes laboratorios (Zbinden y Flury-Roversi, 1981; Lorke, 1983).

La selección de las dosis para estudios de toxicidad subaguda o crónica se realiza comunmente mediante la administración repetida de dosis en un simple experimento piloto sobre unos cuantos animales (Zbinden y Flury-Roversi, 1981), durante un tiempo de exposición continua o intermitente (Coffin y cols, 1977; Gardner y cols, 1977). Basados en lo anterior determinamos las dosis utilizadas en éste estudio, el cual fue de tipo subagudo a 32 días e intermitente, ya que la administración intraperitoneal de capsaicina fue a intervalos de tres días con una dosis cada 24 horas por un día de descanso; este día de descanso se propuso con el objetivo de dar tiempo de recuperación a los animales de los traumatismos provocados al realizar la administración intraperitoneal, ya que las exposiciones intermitentes muestran amenaza para la salud y pueden ser tan peligrosas como las exposiciones continuas (Coffin y cols, 1977; Gardner y cols, 1977), y además aprovechar uno de cada dos días de descanso para toma de muestra que también implicaba otro tipo de traumatismo.

La capsaicina indujo de manera significativa el aumento en la frecuencia de EPC MN en sangre periférica con ambas dosis utilizadas en este estudio (1.46 y 1.94 mg/kg). Sin embargo, el aumento significativo en la frecuencia de EPC MN no es inducido al mismo tiempo con ambas dosis durante el periodo

de tratamiento de 32 días, ya que con la dosis de 1.46 mg/kg el aumento es significativo a partir del día 32 de tratamiento (tabla 3) y con la dosis de 1.94 mg/kg éste es significativo a partir del día 16 avo de tratamiento (tabla 4).

La frecuencia de EPC MN en sangre periférica puede ser un sensitivo indicador de daño cromosómico como la prueba de micronúcleos en eritroblastos de médula ósea, como lo comprueban los resultados obtenidos por MacGregor y cols, al realizar simultáneamente la prueba en médula ósea y sangre periférica utilizando tres mutágenos diferentes: la mostaza nitrogenada; el 7,12-dimetil-benz(a)-antraceno y la ciclofosfamida, encontraron que no hay diferencias significativas entre los métodos, y por lo tanto provee una medida directa de genotoxicidad (MacGregor y cols, 1980; Choy y cols, 1985).

Con lo anterior podemos afirmar que la capsaicina resultó ser genotóxica con ambas dosis utilizadas, ya que el aumento en la frecuencia de EPC MN en sangre periférica refleja la existencia de clastogénesis en eritroblastos de médula ósea (Schmid, 1976; Bruce y Heddle, 1979; MacGregor y cols, 1980).

Nagabhushan y Bhide, determinaron mediante estudios in vitro con diferentes cepas de *Salmonella typhimurium* por el método de Ames (Ames y cols, 1975), que la capsaicina era mutagénica utilizando 0.04 mg/caja. También mediante un estudio agudo in vivo utilizando ratones Swiss a los que administraron dosis de 7.5 mg/kg cercana a su correspondiente DL 50 (7.65 mg/kg), encontraron a través de la prueba de micronúcleos, que la capsaicina es mutagénica; sin embargo con una dosis de 1.8 mg/kg, no encontraron evidencia de mutagenicidad (Nagabhushan y Bhide, 1985). Cabe aclarar que las dosis que nosotros utilizamos en el presente estudio subagudo in vivo: 1.46 mg/kg y 1.94 mg/kg, son cercanas a 1.8 mg/kg y si muestran evidencia de mutagenicidad.

De la relación entre EPC con respecto a los ENC, observamos que la capsaicina altera dicha relación dependiendo de la dosis, ya que nosotros observamos en este estudio que con la dosis de 1.46 mg/kg no se induce a ninguna alteración significativa, no así con la dosis de 1.94 mg/kg, la cual resultó ser citotóxica a nivel de médula ósea; ya que una alteración en la relación de EPC con respecto a los ENC indica un efecto de citotoxicidad (Luca y cols, 1985). La dosis de 1.46 mg/kg resultó entonces no ser citotóxica, ya que no altera la relación de EPC con respecto a los ENC.

Nagabhushan y Bhide en 1985, realizaron un estudio agudo con la capsaicina en el que no encontraron alteración en la relación porcentual de EPC con respecto a ENC estadísticamente significativa con las dosis de 7.5 mg/kg y 1.8 mg/kg. Entonces podemos decir que la capsaicina es más genotóxica que citotóxica tanto en tratamientos de tipo agudo como de tipo subagudo.

Las cantidades de capsaicina administradas a los animales en este estudio (1.46 y 1.94 mg/kg), son aproximadamente 50 % y 90 % más altas respectivamente que el promedio de capsaicina: 1 mg/kg consumido durante una comida por una persona de una población rural (Nopanitaya y Nye, 1974). Sin embargo la letalidad de la capsaicina administrada gástricamente a los ratones es mucho menor que por la ruta intraperitoneal. La dosis mínima letal intragástrica de capsaicina por Kg es de alrededor de 100 mg, la cual estaría contenida en cerca de 32.4 g de chile seco. Para una persona de 60 Kg, estos niveles de toxicidad serían comparables al consumo de aproximadamente 1.94 Kg de chiles secos, una cantidad extremadamente alta, pero la sensación picante y el dolor detienen el alto consumo de estos frutos por el hombre, por lo que casos de toxicidad aguda ocurren raramente. La diferencia en la letalidad dependiendo de la ruta de administración es probablemente atribuible a la insolubilidad de la capsaicina en solución acuosa, no obstante esto no es indicador de que no se produzcan alteraciones celulares a nivel gástrico, ya que Glinsukon y cols, observaron cambios histopatológicos en la mucosa gástrica de ratones tratados intraperitonealmente con capsaicina que revelaron necrosis descamativa, con un alto contenido de material mucoso. Algunas células principales y parietales mostraron una aparente palidez basofílica en su citoplasma y vacuolización (Glinsukon y cols, 1980). Nopanitaya y Nye observaron que casi todas las células epiteliales de absorción mostraron núcleos redondos con prominente membrana nuclear oscura, localizados irregularmente a varios niveles dentro de las células en ratas tratadas intragástricamente con una solución de capsaicina en dosis de 1 mg/kg durante 30 minutos (Nopanitaya y Nye, 1974). Las alteraciones observadas en el núcleo de las células de absorción nos pueden sugerir que la capsaicina está dañando el material genético de estas células en una forma similar a como lo hace en los EPC a nivel de médula ósea.

Se dice que el blanco crítico para la inducción de cáncer puede ser el daño al DNA, siendo de esta manera un evento de tipo genético. Dicho evento es un proceso carcinogénico, el

cual consiste en la interacción de moléculas electrofílicas con algunos grupos ricos en electrones, tales grupos los encontramos en el DNA, RNA, y proteínas celulares. Las moléculas electrofílicas pueden surgir ya sea por descomposición espontánea del carcinógeno o por conversión enzimática pasando por uno o más estados hasta uno altamente reactivo, cargado positivamente. Por ejemplo, los hidrocarburos aromáticos, tales como: benzo(a)pireno, conducen a diol-epóxidos; las aminas aromáticas a derivados de arilhidroxilaminas; y las nitrosaminas a sus formas - hidroxiladas. Cada uno de estos intermediarios es entonces capaz de descomponerse espontáneamente a un compuesto electrofílico altamente reactivo (Clayson, 1980).

El hecho de que estas entidades alcancen su blanco crítico que es en este caso el DNA depende de la estabilidad de éste, es decir, que no reaccione antes con otra entidad nucleofílica, aunque esta hipótesis no ha sido probada hasta ahora experimentalmente (Clayson, 1980).

Basados en la hipótesis anterior, considerando a la capsaicina como un hidrocarburo aromático y con los datos que proporcionan Nagabhushan y Ehide, que consisten en reportes acerca del chile como promotor de hepatocarcinogénesis (Adamuya, 1971), también como productos de hepatomas (Hochligatti, 1951) y provocar úlceras gástricas (Schneider y cols, 1956), las cuales pueden desarrollar carcinomas en la mucosa del estómago (Nagabhushan y Ehide, 1985); y además que moléculas similares a capsaicina tales como: (6)-Gingerol y (6)-Shogaol, son mutagénicas (Nakamura y Yamamoto, 1983) podemos decir que la capsaicina produjo mutación y por lo tanto puede ser potencialmente carcinogénica a nivel de aparato digestivo al ser consumida en dosis superiores a 1 mg/kg, dependiendo de la dieta y susceptibilidad de cada individuo (Nopanitaya y Nye, 1974).

C O N C L U S I O N E S

VIII. CONCLUSIONES

- La capsaicina induce la formación significativa de EPC MN de sangre periférica en ratones, con ambas dosis utilizadas en este estudio; diciéndonos con esto que la capsaicina es genotóxica, reflejando la existencia de clastogénesis en eritroblastos de médula ósea.
- La capsaicina produce modificación en la relación porcentual de las células policromáticas con respecto a las normocrómicas con la mayor de las dosis utilizadas, probando con ello que la capsaicina tiene un efecto citotóxico a nivel de médula ósea.
- Dados los resultados obtenidos para ambas dosis, se puede decir que la capsaicina es más genotóxica que citotóxica.

B I B L I O G R A F I A

IX. BIBLIOGRAFIA

1.- Adamuya, I. K. (1971): "The influence of red pepper (*Capsicum annum*) on the induction of liver tumors". Acad. Nank. Gruz SSR soobschride. 65:237-239.

2.- Alcantara, N. and E. W. Speckmann (1976): "Diet, nutrition and cancer". Am. J. Clin. Nutr. 29:1035-1047.

3.- Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975): "Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian* microsome mutagenicity test". Mutation Res. 31:347-364.

4.- Anuras, S., J. Christensen and D. Templeman (1977): "Effect of capsaicin on electrical slow waves in the isolated cat colon". Gut. 18:666.

5.- Barale, R., F. Giorgelli, L. Migliore, R. Ciranni, D. Casini, D. Zucconi and N. Loprieno (1985): "Benzene induces micronuclei in circulating erythrocytes of chronically treated mice". Mutation Res. 144:193-196.

6.- Barcelo, J. R. (1982): *Diccionario Terminológico de Química*; Ed. Alhambra; segunda edición, España; pág. 127.

7.- Bruce, W. R. and J. A. Heddle (1979): "The mutagenic activity of 61 agents as determined by the micronucleus, *Salmonella* and sperm abnormality assays". Can. J. Genet. Cytol. 21:319-334.

8.- Cabanac, M., M. Cormarecho-Leydier and L. J. Poirior (1976): "The effect of capsaicin on temperature regulation of the rat". Pflugers Arch. Ges. Physiol. 366:217.

9.- Choy, W. N., J. T. MacGregor, M. D. Shelby and R. R. Maronpot (1985): "Induction of micronuclei by benzene in B6C3F₁ mice: Retrospective analysis of peripheral blood smears from the NTP carcinogenesis bioassay". Mutation Res. 143:55-59.

10.- Clayson, D. B. (1980): "Comparison between in vitro and in vivo tests for carcinogenicity". Mutation Res. 75:205-203.

11.- Coffin, D. L., D. E. Gardner, G. I. Sidorenko and Pinigin (1977): "Role of time as a factor in the toxicity of chemical compounds in intermittent and continuous exposures. Part II. Effects of intermittent exposure". J. Toxicol. Environ. Health. 3:821-823.

12.- Cole, R. J., N. A. Taylor, J. Cole and C. F. Arlett (1979): "Transplacental effects of chemical mutagens detected by the micronucleus test". Nature. 277:318-319.

13.- Cole, R. J., N. Taylor, J. Cole and C. F. Arlett (1981): "Short term test for transplacentally active carcinogens. I. Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts". Mutation Res. 80:141-157.

14.- Countryman, P. I. and J. A. Heddle (1976): "The production of micronuclei from chromosomal aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes". Mutation Res. 41:321-332.

15.- Daniel, W. W. (1984): "Bioestadística": Base para el análisis de las ciencias de la salud". Ed. Limusa; México. Pág. 99:132-134.

16.- Desai, H. G., K. Venugopalan, M. Phillipose, H. P. Zaveri, R. H. Kalro and F. P. Antia (1977): "Effects of red chilli powder on gastric mucosal barrier and acid secretion". Ind. J. Med. Res. 6:440.

17.- Evans, H. J., G. J. Neary and F. S. Williamson (1959): "The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen, part. II. Chromosome damage: The production of micronuclei". Int. J. Radiat. Biol. 3:216-229.

18.- Faulkner, D. C. and J. W. Growcott (1980): "Effects of neonatal capsaicin administration on the nociceptive response of the rat to mechanical and chemical stimuli". J. Pharm. Pharmacol. 32:656-657.

19.- Gardner, D. E., D. L. Coffin, M. A. Pinigin, G. I. Sidorenko (1977): "Role of time as a factor in the toxicity of chemical compounds in intermittent and continuous exposures. Part. I. Effects of continuous exposure". J. Toxicol. Environ. Health. 3:811-820.

20.- Gavirto de la Torre, G., C. Juárez y H. H. Figueroa (1982): Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo. Ed. Limusa, México. Pág. 57 y 58.

21.- Glinsukon, T., V. Stitmunnaithum, C. Toskulkao, T. Buranawuti and V. Tangakrisanavinont (1980): "Short communications acute toxicity of capsaicin in several animal species". Toxicol. 18:215-220.

22.- Gorla, N. B. and J. A. Castro (1985): "Micronucleus formation in bone marrow of mice treated with nifurtimox or benznidazole". Toxicol. Lett. 25:259-263.

23.- Grover, I. S. and P. K. Malhi (1985): "Genotoxic effects of some organophosphorous pesticides I. Induction of micronuclei in bone marrow cells in rat". Mutation Res. 155:131-134.

24.- Hart, J. W. and Berly Hartley-Asp (1983): "Induction of micronuclei in the mouse. Revised timing of the final stage of erythropoiesis". Mutation Res. 120:127-132.

25.- Hart, J. W. and H. Engberg-Pedersen (1983): "Statistics of the mouse bone-marrow micronucleus test: counting, distribution and evaluation of results". Mutation Res. 111:195-207.

26.- Hayashi, M. T. Sofuni and M. Ishidate Jr. (1984): "Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow". Mutation Res. 127:129-137.

27.- Hayes, A. G., J. W. Scadding, M. Skingle and M. B. Tyers (1981): "Effects of neonatal administration of capsaicin on nociceptive thresholds in the mouse and rat". J. Pharm. Pharmacol. 33:183-185.

28.- Heddle, J. A. (1973): "A rapid in vivo test for chromosomal damage". Mutation Res. 18:187-190.

29.- Heddle, J. A. and Carrano (1977): "The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: Evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments". Mutation Res. 44:63-69.

30.- Heddle, J. A., M. Hite, B. Kirkhart, K. Mavournin, J. T. MacGregor, G. W. Newell and M. F. Salamone (1983): "The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity". A report of the U. S. Environmental Protection Agency. Gene-Tox Program. Mutation Res. 123:61-118.

31.- Henderson, L., R. Cole, J. Cole, H. Cole, Z. Aghamohammadi and T. Regan (1984): "Sister-chromatid exchange and micronucleus induction as indicators of genetic damage in maternal and foetal cells". Mutation Res. 126:47-52.

32.- Hochligatti, C. (1951): "Production of liver tumors by dietary means. Effect of feeding chillies". Acta. Unio. Int. Contra. Cancrum. 7:606-611.

33.- Jancso-Gabor, A., J. Szolcsanyi and N. Jancso (1970): "Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat-sensitive structure by capsaicin in rats". J. Physiol. 208:449.

34.- Jenssen, D. A. G. and C. Ramel (1978): "Factors affecting the induction of micronuclei at low doses of X-rays, MMS and dimethylnitrosamine in mouse erythroblast". Mutation Res. 58:51-65.

35.- Kreyszig, E. (1976): "Introducción a la Estadística Matemática. Principios y Métodos; Ed. Limusa, México. Pág. 391, 403, 404.

36.- Lorke, D. (1983): "A new approach to practical acute toxicity testing". Arch. Toxicol. 54:275-287.

37.- Luca, D., L. Răileanu, V. Luca and R. Duda (1985): "Chromosomal aberrations and micronuclei induced in rat and mouse bone marrow cells by sodium nitrate". Mutation Res. 155:121-125.

38.- Luke, C. A., R. R. Tice and R. T. Drew (1988): "The effect of exposure regimen and duration on benzene-induced bone marrow damage in mice. I. Sex comparison in DBA/2 mice". Mutation Res. 203:251-271.

39.- MacGregor, J. T., C. M. Wehr and D. H. Gould (1980): "Clastogen Induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test". Environ Mutagenesis. 2:509-514.

40.- Mackey, B. E. and J. T. MacGregor (1979): "The micronucleus test. Statistical design and analysis". Mutation Res. 64:195-204.

41.- Maier, F. and W. Schmid (1976): "Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test". Mutation Res. 40:325-338.

42.- Makara, G. B., L. Csalay, R. Frenkl, Z. Somfai and Szepeshazi (1965): "Effect of capsaicin on experimental ulcer in the rat". Acta. Med. Hung. 21:213.

43.- Mann, N. S. (1977): "Capsaicin induced acute erosive gastritis: its prevention by antacid, metiamide and cimetidine". J. Ky. Med. Assoc. 75:71.

44.- Monsereenusorn, Y. and T. Glinsukon (1979): "The inhibitory effect of capsaicin on intestinal glucose absorption in vivo. I. Effect of capsaicin on the serosal side of everted intestinal sacs". Toxicol. Lett. 4:393.

45.- Monsereenusorn, Y., S. Kongsamut and P. D. Pezalla (1982): "Capsaicina. A literature survey". CRC. Crit. Rev. Toxicol. 10:321-339.

46.- Nagabhushan, M. and S. V. Bhide (1985): "Mutagenicity of chili extract and capsaicin in short-term test". Environ. Mutagenesis. 7:881-888.

47.- Nakamura, H. and T. Yamamoto (1983): "The active part of the (6)-gingerol molecule in mutagenesis". Mutation Res. 122:87-94.

48.- Nopanitaya, W. and S.W. Nye (1974): "Duodenal mucosal response to the pungent principle of hot pepper (capsaicin) in the rat: light and electron microscopy study". Toxicol. Appl. Pharmacol. 30:149-161.

49.- Schlegel, R. and J. T. MacGregor (1982): "The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: detection of chronic chromosome breakage in mice". Mutation Res. 104:367-369.

50.- Schlegel, R. and J. T. MacGregor (1983): "A rapid screen for cumulative chromosomal damage in mice. Accumulation of circulating micronucleated erythrocytes". Mutation Res. 113:481-487.

51.- Schlegel, R. and J. T. MacGregor (1984): "The persistence of micronucleated erythrocytes in peripheral circulation of normal and splenectomized Fischer 344 rats: Implications for cytogenetic screening". Mutation Res. 127:169-174.

52.- Schmid, W. (1975): "The micronucleus test". Mutation Res. 31:9-15.

53.- Schmid, W. (1976): The micronucleus test for cytogenetic analysis. Hollaender A: "Chemical Mutagens". New York: Plenum.4:31-53.

54.- Szolcsanyi, J. (1977): "Pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibers and receptor endings in mediation of pain". J. Physiol. 73:251.

55.- Tannenbaum, A. and H. Silverstone (1953): "Nutrition in relation to cancer". Weinhouse S: "Advances in cancer research". New York: Academic Press. 1:451-501.

56.- The Index-Merk (1983); Decima edición; U. S. A. pag. 243-244.

57.- Thompson, J. S. y M. W. Thompson (1980): *Genética Médica*. Ed. Salvat; segunda edición, Barcelona. pag.261-263.

58.- Toda, N., H. Usui, N. Nishino and M. Fujiwara (1972): "Cardiovascular effects of capsaicin in dogs and rabbits". J. Pharmacol. Exp. Ther. 181:512-521.

59.- Tho, C. C., T. S. Lee and A. K. Kiang (1955): "The pharmacological actions of capsaicin and analogues". Br. J. Pharmac. 19:175.

60.- Tongyai, S. (1977): "Effect and mechanism of capsaicin on gastric acid secretion and H-transporting enzyme in the rat". M. S. thesis Mahidol University, Bangkok Thailand.

61.- Trease-Evans. (1984): *Farmacognosia*. Ed. C.E C.S.A. México. Pág. 675-678.

62.- Tsuchimoto, T. and B. E. Matter (1979): "In vivo cytogenetic screening methods for mutagens, with special reference to the micronucleus test". Arch. Toxicol. 42:239-248.

63.- Valle, P. (1986): Toxicología de Alimentos. Centro panamericano de Ecología humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud, O. M. S. Pág. 61-63.

64.- Von Ledebur, M. and W. Schmid (1973): "The micronucleus test: methodological aspects". Mutation Res. 19:109-117.

65.- Wallis, T. E. (1966): Manual de Farmacognosia; Edit. C.E.C.S.A. México. Pág. 301-305.

66.- Yamamoto, K. I. and Y. Kikuchi (1980): "A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons". Mutation Res. 71:127-131.

67.- Zbinden, G. and M. Flury-Roversi (1981): "Significance of the LD₅₀-test for the toxicological evaluation of chemical substances". Arch. Toxicol. 47:77-99.